

**І.С.Шпонька
Т.В.Шинкаренко**

Державний заклад
«Дніпропетровська ме-
дична академія Мініс-
терства охорони здо-
ров'я України»

Ключові слова: дифу-
зна гліома, імуногісто-
хімія, діагностика, ін-
декс проліферації, ангі-
огенез, проміжний фі-
ламент, матриксна ме-
талопротеїназа.

Надійшла: 22.07.2017

Прийнята: 20.08.2017

УДК 616.831-006-036:612.017

КОМПЛЕКСНИЙ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ДИФУЗНИХ ГЛІОМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

*Дослідження виконано в рамках науково-дослідних робіт «Патоморфологічна діагно-
стика та прогноз перебігу новоутворень різних локалізацій з урахуванням маркерів
біологічних властивостей» (номер державної реєстрації 0112U006965) і «Розробка
діагностичних та прогностичних критеріїв новоутворень різних локалізацій з ураху-
ванням біологічних показників активності пухлинного процесу» (номер державної ре-
єстрації 0116U002827).*

Реферат. Диференційна діагностика дифузних гліальних пухлин головного мозку ускладнена морфологічною подібністю пухлин, які мають різний злоякісний потенціал. Тому метою цього дослідження було оптимізувати діагностику гліальних пухлин голо-
вного мозку шляхом визначення диференційних морфологічних критеріїв на підставі
вивчення особливостей імуногістохімічної експресії маркерів біологічних властивостей
клітин. Проведено аналіз порушень регуляції клітинного циклу (Ki-67, EGFR), апопто-
зу (p53), репарації ДНК (MGMT), протеолізу навколишньоклітинного матриксу (MMP3
і MMP9), порушень метаболічних процесів (IDH1 R132H), змін ІГХ статусу за протеї-
німи проміжних філаментів (GFAP, віментину, панцитокератину AE1/AE3), а також
параметрів мікроциркуляторного русла в залежності від клініко-морфологічних характе-
ристич дифузних гліом. Визначені імунофенотипи властиві для пухлин різного гістоло-
гічного типу та ступеня злоякісності за класифікацією ВООЗ.

Morphologia. – 2017. – Т. 11, № 3. – С. 39-46.

© І.С.Шпонька, Т.В.Шинкаренко, 2017

✉ timash3061990@gmail.com

Shpon'ka I.S., Shynkarenko T.V. Complex immunohistochemical analysis of diffuse gliomas of the brain.

ABSTRACT. Background. Differential diagnostics of diffuse gliomas is complicated by the morphological similarity of tumors that have a different malignant potential. **Objective.** Therefore, the aim of this study was to optimize the diagnostic morphological criteria of glial brain tumors on the basis of studying the immunohistochemical expression of markers of biological properties of cells. **Methods.** Range of primary antibodies (Ki-67, EGFR, p53, MGMT, MMP3, MMP9, GFAP, vimentin, cytokeratin AE1/AE3, IDH1 R132H) was used for IHC. Contingency tables were analyzed with Fisher's exact test. Spearman rank coefficient was computed to identify a relationship between morphometric parameters and tumor Grade. **Re-
sults.** Authors have analyzed cell kinetics, apoptosis, DNA repair, proteolysis of extracellular matrix, metabolic disorders, and changes in the expression of intermediate filaments, angiogenesis. Immunophenotypes were defined for adult glial tu-
mors (Grade II, Grade III and Grade IV; astrocytic and oligodendroglial gliomas). Morphological differential criteria were proposed. **Conclusion.** Immunophenotype characteristics of tumors of different histological type and WHO Grade were de-
termined.

Key words: diffuse glioma, immunohistochemistry, diagnostics, proliferation index, angiogenesis, intermediate filament, matrix metalloproteinase.

Citation:

Shpon'ka IS, Shynkarenko TV. Complex immunohistochemical analysis of diffuse gliomas of the brain. Mor-
phologia. 2017;11(3):39-46. Ukrainian.

Вступ

Злоякісні новоутворення головного мозку (ГМ) характеризуються низьким рівнем вижива-
ності: 50,1% хворих прожили менше року після
встановлення такого діагнозу в 2014 році за да-
ними українського канцер-реєстру [1], що значно
менше показника розвинутих країн [2]. Гістоло-
гічно більше двох третин злоякісних новоутво-
рень ГМ належать до групи дифузних гліальних
пухлин з ознаками астроцитарного чи олігоденд-

рогліального диференціювання та Grade II-IV (за
класифікацією ВООЗ) [2]. Лікування пацієнтів з
дифузними гліомами включає обов'язкове хірур-
гічне втручання (якщо немає протипоказань), а
також променеву і хіміотерапію, особливості
призначення яких залежать від остаточного мор-
фологічного діагнозу та деяких клінічних пара-
метрів. В 2015 році комплексне або комбіноване
лікування було надано 32,5% українських пацієн-
тів із верифікованим злоякісним новоутворен-

ням ГМ [1], що свідчить про значну затребуваність верифікації патоморфологічного діагнозу, навіть за умов відносної недоступності високо-спеціалізованої медичної допомоги.

Морфологічна подібність гліом із групи «дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлин» різного ступеня злоякісності зумовлює формування досить численних діагнозів з вказівкою на два ступені злоякісності за ВООЗ (Grade II-III чи III-IV), а також на два типи («олігоастроцитом»), «анапластична олігоастроцитом»). Такий діагноз є попереднім і потребує уточнення за допомогою додаткових методів дослідження пухлинної тканини. Тим більш, що правомочність термінів «олігоастроцитом (Grade II)» та «анапластична олігоастроцитом (Grade III)» експертами ВООЗ вважається сумнівним [3]. Крім того, результати молекулярного субтипуювання злоякісних гліом можуть сприяти розумінню молекулярних шляхів морфогенезу й індивідуалізації схем їх лікування та прогнозуванню термінів виживання хворих [4].

До 2016 року в стандарти ведення пацієнтів з гліомами (ESMO, CGCG та ін.) були включені загальні рекомендації щодо використання імуногістохімічного (ІГХ) статусу за IDH1 R132H, MGMT, Ki-67 [5;6], а у 2016 році молекулярні властивості стали провідними діагностичними критеріями в класифікації пухлин ЦНС ВООЗ [3]. Проте визначення ролі особливостей експресії певних генів та накопичення відповідних протеїнів, а також розробка методів дослідження та інтерпретації їх результатів залишаються актуа-

льними напрямками наукових розробок.

Мета дослідження – оптимізувати діагностику гліальних пухлин головного мозку шляхом визначення диференційних критеріїв на підставі вивчення особливостей імуногістохімічної експресії маркерів біологічних властивостей клітин.

Матеріали та методи

Ретроспективно був досліджений матеріал 52 пацієнтів, які лікувалися в нейрохірургічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І.Мечникова протягом 2010-2017 рр. Вік у групі коливався від 22 до 73 років, середній вік пацієнтів становив $43,12 \pm 11,20$ років. Співвідношення чоловіків і жінок склало 1,08:1. Гістологічний діагноз був встановлений згідно сучасних гістологічних та імуногістохімічних критеріїв ВООЗ [3]. В дослідження були включені 7 дифузних астроцитом (Grade II), 9 анапластичних астроцитом (Grade III), 24 гліобластоми (Grade IV), 7 олігодендрогліом (Grade II), 5 анапластичних олігодендрогліом (Grade III). Пацієнти не отримували хіміо- чи радіотерапії до первинного оперативного втручання (для виключення впливу лікувального патоморфозу на результати дослідження).

Імуногістохімічний метод. ІГХ дослідження проводилось згідно протоколів компанії TermoScientific (TS, США): у зрізах завтовшки 4 мкм використовували первинні антитіла (табл. 1), систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США).

Таблиця 1

Панель первинних антитіл

| Антитіло | Клон | Розведення | Виробник |
|------------------------|------------------|------------|-----------------------|
| Ki-67 | клон SP6 | 1:400 | TermoScientific, США |
| p53 | клон SP5 | 1:200 | TermoScientific, США |
| MGMT | клон Ab-1 | 1:25 | TermoScientific, США |
| EGFR | клон EP38Y | 1:200 | TermoScientific, США |
| GFAP | поліклон | RTU | DakoCytomation, Данія |
| Віментин | клон sp20 | 1:200 | TermoScientific, США |
| Панцитокератин AE1/AE3 | клон Ab-1 | 1:50 | TermoScientific, США |
| IDH1 R132H | клон H09 | 1:40 | Dianova, Німеччина |
| MMP3 | клон SL-1 ID3 | 1:200 | TermoScientific, США |
| MMP9 | клон Ab-1 GE-213 | 1:200 | TermoScientific, США |

Для оцінки результатів ІГХ реакцій використано напівкількісний аналіз цифрових зображень [7]. Імуногістохімічно забарвлені зрізи були оглянуті за допомогою мікроскопу Axio Scope.A1. Кожний зразок було проілюстровано трьома зображеннями (у форматі *.JPEG) полів зору з найбільшим рівнем експресії цифровою фотокамерою Canon 1200D.

Індекс проліферації за Ki-67 (ІП), індекс ін-

трануклеарної експресії p53 та MGMT визначали за методикою описаною раніше [8], як середнє значення співвідношення кількості Ki-67- (p53-, MGMT-) імунореактивних ядер до кількості пухлинних ядер у фотографіях «гарячих точок» новоутворення з найбільшим скупченням клітин з ІГХ мітками (ImageJ з додатком PointPicker).

Цитоплазматичне/мембранне накопичення GFAP, віментину, панцитокератину AE1/AE3,

MMP, IDH1 R132H та EGFR визначали за напів-кількісною шкалою з урахуванням інтенсивності забарвлення: «-» (негативне), «+» (позитивне), «++» (надмірне, виражена). Порогові значення обирались для кожного маркера окремо, з урахуванням аналізу літератури та отриманих нами вимірювань. Площа імунореактивної тканини визначалася за рахунок послідовних деконволюцій, бінаризації, гістограми кольорів (ImageJ).

Дослідження мікросудин було проведено за рахунок GFAP-негативності просвіту та стінки судин при GFAP-імунореактивності оточуючої пухлинної тканини. Рахували кількість мікросудин у ділянках з найінтенсивнішим ангиогенезом; підраховували щільність розташування мікросудин (ЩРМ, мм⁻²) за формулою:

$$\text{ЩРМ} = \frac{\text{найбільша кількість судин в одному зображенні, зб. 400 (з 3 - ох зон з найбільшою щільністю)}}{\text{площа сфотографованої ділянки зрізу, зб. 400 (в мм}^2\text{)}}$$

Статистичний аналіз був проведений за допомогою програмного забезпечення DoctorStat (версія 1.9) та ліцензійної програми SPSS Statistica 17.0. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне значення, m – стандартна похибка середнього. Кореляційний аналіз виконували на основі значень рангового коефіцієнта Спірмена. Статистичну значущість відмінності

результатів у групах досліджуваних пухлин було перевірено з використанням точного тесту Фішера (2xN), враховуючи очікувані значення у таблиці спряженості менше 5. Враховуючи затребуваність диференційно-діагностичних критеріїв олігодендрогліальних та астроцитарних пухлин Grade II-III, для визначення вірогідності відмінностей їх параметрів проводили додаткове виключення показників гліобластом (з групи астроцитарних гліом). Значення $p < 0,05$ було прийнято статистично значущим [9].

Результати та їх обговорення

Аналіз процесів регуляції клітинного циклу та репарації ДНК. Накопичення ядерних антигенів (Ki-67, p53, MGMT) у пухлинних клітинах визначали за допомогою відповідних первинних антитіл, розраховуючи частку імунореактивних ядер у трьох полях зору, виключаючи ендотелій судин, нейрони та інші клітини, що не відносяться до пухлинних диферонів. З таблиці 2 виходить, що III пухлинних клітин прямо пов'язаний із ступенями злоякісності гліоми ($r=0,756$; $p < 0,05$), проте статистична значущість відмінностей була зафіксована тільки між низькозлоякісними (Grade II) гліальними пухлинами з одного боку і анапластичними (Grade III) гліомами ($p=0,0001$) та гліобластомами ($p < 0,0001$) з іншого.

Таблиця 2
Розподіл значень інтенсивності експресії Ki-67, EGFR, P53, MGMT в залежності від клініко-морфологічних характеристик дифузних гліом головного мозку (n, p)

| | Всього n = 52 | | III (Ki-67) >10% | | p | p53 >10% | | p | MGMT >10% | | p | EGFR >50% | | p | III (Ki-67) ендотелію >10% | | p |
|----------------------|---------------|----|------------------|--|---------|----------|--|--------|-----------|--|-------|-----------|--|--------|----------------------------|--|---------|
| Стать | | | | | 0,778 | | | 1 | | | 0,404 | | | 0,389 | | | 0,227 |
| чоловіча | 27 | 17 | | | | 14 | | | 12 | | | 19 | | | 17 | | |
| жіноча | 25 | 14 | | | | 12 | | | 8 | | | 14 | | | 20 | | |
| Вік | | | | | 0,002* | | | 1 | | | 0,575 | | | 0,149 | | | 0,013* |
| <50 | 31 | 13 | | | | 16 | | | 13 | | | 18 | | | 18 | | |
| >50 | 21 | 18 | | | | 10 | | | 7 | | | 15 | | | 19 | | |
| III (Ki-67) | | | | | | | | 0,174 | | | 0,260 | | | 0,003* | | | 0,001** |
| <10 | 21 | | | | | 8 | | | 6 | | | 8 | | | 9 | | |
| >10 | 31 | | | | | 18 | | | 14 | | | 25 | | | 28 | | |
| Тип пухлини | | | | | 0,048* | | | 0,030* | | | 0,330 | | | 0,739 | | | 0,025* |
| астроцитарний | 40 | 27 | | | | 23 | | | 17 | | | 26 | | | 32 | | |
| олігодендрогліальний | 12 | 4 | | | | 3 | | | 3 | | | 7 | | | 5 | | |
| Grade пухлини | | | | | 0,001** | | | 0,285 | | | 0,194 | | | 0,001* | | | 0,001** |
| Grade II | 14 | 0 | | | | 5 | | | 4 | | | 3 | | | 4 | | |
| Grade III | 14 | 11 | | | | 6 | | | 5 | | | 9 | | | 11 | | |
| Grade IV | 24 | 20 | | | | 15 | | | 11 | | | 21 | | | 22 | | |

Примітки: *відмінність статистично значуща при $p < 0,05$; ** значення $p < 0,001$.

ІІ за Ki-67 був вищим в астроцитарних пухлинах ($p=0,048$), але при порівнянні гліом, які належать тільки до Grade II-III, різниця нівелювалася ($p=0,459$), що свідчило про непридатність цього параметру для диференційної діагностики між пухлинами астроцитарного та олігодендрогліального ряду.

Проліферація пухлин визначається складними взаємодіями численних протеїнів, серед яких досліджуваними нами p53 і EGFR. Продукт експресії диного гену TP53 не тільки впливає на механізми апоптозу, а й блокує процеси клітинного поділу в фазі G1. Інактивація цього механізму передбачувано призводить до підвищення здатності клітин до самовідтворення [10]. Втім, ми не знайшли значущої залежності p53-імунореактивності при розподілі випадків за ІІ пухлинних клітин ($p=0,174$) та Grade за BOO3 ($p=0,285$). Значно більше експресували TP53 астроцитарні пухлини (57,5%), ніж олігодендрогліальні (25%), $p=0,030$ (табл. 2).

Для адекватного вибору хіміотерапевтичного лікування велике значення має визначення наявності метилювання або надекспресії гену MGMT [5;6]. Однак, суттєвого діагностичного значення MGMT-імунореактивності нами виявлено не було (табл. 2): всі клініко-морфологічні параметри були статистично незалежними від

рівня експресії гену MGMT ($p<0,05$).

Мембранне або мембранно-цитоплазматичне накопичення рецепторів епідермального фактору росту (EGFR), так як і наступних досліджуваних протеїнів, аналізували на основі обчислення максимальної площі забарвлення хромогеном DAB (у %). Для надекспресії EGFR за порогове значення прийняли 50% площі. Аналіз розподілу випадків показав прямі зв'язки надекспресії EGFR з Grade ($p<0,001$) та ІІ пухлинних клітин ($p=0,003$) дифузних гліом (табл. 2). Значуща відмінність за надекспресією EGFR була зафіксована між групами гліобластом та дифузних гліом головного мозку Grade II-III ($p<0,001$). Надекспресією EGFR частіше реєстрували у астроцитарних пухлинах (65,0%), ніж в олігодендрогліальних (58,3%). Треба відмітити, що виключивши гліобластоми (Grade IV) із підгрупи астроцитарних, відмінність між типами гліом залишалася статистично незначущою, $p=0,250$.

Аналіз експресії генів проміжних філаментів (табл. 3). Пухлинні клітини дифузних астроцитарних і олігодендрогліальних пухлин характеризуються синтезом проміжних філаментів, які складаються з гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та віментину, іноді – додатково нестину та сіменину [11].

Таблиця 3
Розподіл значень інтенсивності GFAP-, віментин- та панцитокератин-імунореактивності в залежності від клініко-морфологічних характеристик дифузних гліом головного мозку (n, p)

| | Всього n = 52 | | | GFAP >40% | | p | | ЩРМ >100/мм ² | | p | | віментин >40% | | p | | панцитокератин >10% | | p |
|----------------------|---------------|----|--------|-----------|----|---|--------|--------------------------|--|---|---------|---------------|----|---|--------|---------------------|--|---|
| Стать | | | 0,133 | | | | 1 | | | | 1 | | | | 1 | | | |
| чоловіча | 27 | 25 | | 14 | 12 | | | 10 | | | | 12 | 10 | | | | | |
| жіноча | 25 | 19 | | 13 | 12 | | | 13 | | | | 12 | 13 | | | | | |
| Вік | | | 0,049* | | | | 0,026* | | | | 0,403 | | | | 0,400 | | | |
| <50 | 31 | 29 | | 12 | 16 | | | 12 | | | | 16 | 12 | | | | | |
| >50 | 21 | 15 | | 15 | 8 | | | 15 | | | | 8 | 11 | | | | | |
| ІІ | | | 1 | | | | 0,047* | | | | 0,049* | | | | 0,004* | | | |
| <10 | 21 | 18 | | 7 | 6 | | | 7 | | | | 6 | 4 | | | | | |
| >10 | 31 | 26 | | 20 | 18 | | | 20 | | | | 18 | 19 | | | | | |
| Тип пухлини | | | 0,011* | | | | 0,193 | | | | 0,003* | | | | 0,015* | | | |
| астроцитарний | 40 | 37 | | 23 | 23 | | | 23 | | | | 23 | 21 | | | | | |
| олігодендрогліальний | 12 | 7 | | 4 | 1 | | | 4 | | | | 1 | 2 | | | | | |
| Grade пухлини | | | 0,258 | | | | 0,004* | | | | 0,001** | | | | 0,013* | | | |
| Grade II | 14 | 10 | | 2 | 1 | | | 2 | | | | 1 | 3 | | | | | |
| Grade III | 14 | 12 | | 9 | 2 | | | 9 | | | | 2 | 4 | | | | | |
| Grade IV | 24 | 22 | | 16 | 21 | | | 16 | | | | 21 | 16 | | | | | |

Примітки: *відмінність статистично значуща при $p<0,05$; ** значення $p<0,001$.

Гліальні пухлини характеризуються високим рівнем експресії GFAP, але олігодендрогліальні пухлини відзначалися суттєво меншою GFAP-імунореактивністю в порівнянні з астроцитарними ($p=0,011$), до того ж навіть при виключенні з групи астроцитарних пухлин гліобластом ця відмінність зберігалась ($p=0,043$). Але дифузні гліоми не продемонстрували Grade-залежності рівня експресії GFAP ($p=0,258$) (табл. 3).

Виражена експресія віментину (порогове значення було $>40\%$ площі) була характерна для гліобластом, на відміну від дифузних гліом Grade II-III ($p<0,001$). Переважання астроцитарних пухлин серед гліом з високими рівнями експресії віментину ($p=0,003$) зникало при виключенні гліобластом ($p=1$). Відсутність експресії віментину, що продемонстрували 50% олігодендрогліальних пухлин може бути використана в якості додаткового критерію для верифікації типу пухлини ($p=0,001$).

Хибно-позитивний статус за протеїнами епітеліальних проміжних філаментів (панцитокератин AE1/AE3) пояснюють перехресною реакцією суміші антитіл до кератинів з GFAP, крім того у гліобластомах можуть зустрічатися епітеліоїдні ділянки, що експресують цитокератини [12]. Відповідно відзначалась Grade-залежність панцитокератин-позитивного статусу зразків при пороговому значенні $>10\%$ площі ($p=0,013$) з переважанням панцитокератин-позитивних гліобластом над такими анапластичними гліомами ($p=0,042$). Нижча частка імунореактивних олігодендрогліальних пухлин (табл. 3) все ж не мала статистичної відмінності від астроцитарних (на умовах неврахування гліобластом серед останніх), $p=0,661$.

Аналіз показників мікросудинного русла дифузних гліом ГМ. Проліферація із збільшенням щільності розташування пухлинних клітин призводить спочатку до залучення вже існуючих судин (інкорпорація), а потім викликає брудкування останніх і формування численних відгалужень (ангіогенез) [10]. ІІ ендотелію мікросудин, який характеризує напруженість процесів ангіогенезу, визначався на основі Ki-67-імунореактивності клітин (табл. 2). Були встановлені суттєві відмінності за вказаним параметром серед пухлин Grade II і Grade III ($p=0,021$). Астроцитарні та олігодендрогліальні пухлини Grade II-III характеризувалися подібними значеннями ІІ ендотелію ($p=0,445$).

ЩРМ вивчали на основі GFAP-імунонегативності мікросудин при вираженій/помірній експресії відповідного гену пухлинними клітинами. Перевагою цього методу можна визнати одночасну диференціацію пухлинної тканини від оточуючої інфільтрованої тканини ГМ, що дозволяє вивчати судини саме центральної частини пухлин Grade III-IV. ЩРМ прямо

сильно корелювала з Grade за BOO3 ($r=0,726$; $p<0,05$). Високі значення ЩРМ ($>100/\text{мм}^2$) достовірно частіше зустрічали у пухлинах Grade III та Grade IV, ніж дифузних гліомах Grade II ($p=0,018$ і $p=0,002$ відповідно) (табл. 3).

Аналіз метаболічних змін у дифузних гліомах (табл. 4). Загальновідомо, що інвазивні властивості клітин забезпечуються численними механізмами, серед яких найдослідженішим є руйнування навколишньоклітинного матриксу (НКМ). НКМ є складною мережею, побудованою з макромолекул міжклітинного простору, таких як колаген, протеоглікани, фібронектин, ламінін та ін.; виконує функцію бар'єру на шляху переміщення неопластично трансформованих клітин. Протеоліз НКМ відбувається під впливом ферментів, які входять здебільшого до родини матриксних металопротеїназ (MMPs), надмірний синтез яких зафіксовано у великій кількості солідних новоутворень [13]. Було відмічено накопичення MMPs ендотелієм, пухлинними клітинами (особливо перинуклеарно) та навколишньоклітинно (ділянки некрозу, кальцифікати).

Проведений аналіз рівня внутрішньоклітинного і навколишньоклітинного накопичення MMP3 (стромелізін-1) і MMP9 (желатиназа В/колагеназа IV) дозволив виділити групи пухлин з високою і низькою протеолітичною активністю. При такому розподілі було зафіксовано виражений зв'язок накопичення MMP та Grade пухлини за класифікацією BOO3 ($p<0,05$), при цьому відмінності були у групах низькозлакісних і анапластичних гліом за MMP3 ($p=0,014$), та між анапластичними пухлинами і гліобластомами за MMP9 ($p=0,037$). Астроцитарні та олігодендрогліальні пухлини характеризувалися подібними показниками протеолітичної активності, $p>0,05$ (табл. 4), а при виключенні гліобластом ступінь подібності навіть зросла для обох ензимів.

Мутація IDH1 R132H, точкова (R) зміна в 132 кодоні гену ізоцитрат дегідрогенази-1 (IDH1), що призводить до зміни амінокислотного залишка у ланцюгу кодованого протеїну на гістидин (H), вважається раннім етапом онкогенезу дорослих типів дифузних гліом, окрім первинних гліобластом. Часткова або тотальна експресія відповідного протеїну пухлиною свідчить з високою ймовірністю про відповідні онкогенетичні механізми [14]. При аналізі IDH1 R132H-імунореактивності був виявлений зворотній зв'язок ІГХ статусу за IDH1 R132H і Grade пухлини ($p<0,001$), хоча значимі відмінності були зареєстровані тільки між групою анапластичних пухлин (Grade III) і групою гліобластом, Grade IV ($p<0,001$), що пояснюється переважанням первинних гліобластом (табл. 4). Показники астроцитарних та олігодендрогліальних типів були подібними при виключенні з астроцитарної підгрупи гліобластом.

Розподіл значень інтенсивності експресії IDH1 R132H, MMP3 та MMP9 в залежності від клініко-морфологічних характеристик дифузних гліом головного мозку (n, p)

| | Всього n = 52 | MMP3 >40% | p | MMP9 >40% | p | IDH1 R132H + | p |
|----------------------|---------------|--------------|--------|--------------|--------|-----------------|---------|
| Стать | | | 0,781 | | 0,403 | | 0,266 |
| чоловіча | 27 | 15 | | 17 | | 16 | |
| жіноча | 25 | 12 | | 12 | | 10 | |
| Вік | | | 0,026* | | 0,023* | | 0,572 |
| <50 | 31 | 12 | | 13 | | 17 | |
| >50 | 21 | 15 | | 16 | | 9 | |
| ІП | | | 0,002* | | 0,002* | | 0,004* |
| <10 | 21 | 5 | | 6 | | 16 | |
| >10 | 31 | 22 | | 23 | | 10 | |
| Тип пухлини | | | 0,193 | | 0,329 | | 0,012* |
| астроцитарний | 40 | 23 | | 24 | | 15 | |
| олігодендрогліальний | 12 | 4 | | 5 | | 11 | |
| Grade пухлини | | | 0,003* | | 0,037* | | 0,001** |
| Grade II | 14 | 2 | | 6 | | 12 | |
| Grade III | 14 | 8 | | 5 | | 11 | |
| Grade IV | 24 | 17 | | 18 | | 3 | |

Примітки: *відмінність статистично значуща при $p < 0,05$; ** значення $p < 0,001$.

Хоча абсолютні та відносні показники експресії досліджуваних генів відрізняються у різних дослідників, загальні тенденції та закономірності розподілу значень серед гліальних пухлин різного ступеня злоякісності і гістологічного типу в більшості випадків збігаються. Така особливість ІГХ показників пов'язана з регіонарною неоднорідністю пухлинної тканини, невеликою кількістю досліджуваних пацієнтів (навіть у великих дослідженнях використовують декілька сотень випадків, проте, як правило, вони носять мультицентровий характер), різними нестандартизованими методиками проведення ІГХ реакцій, їх обліку та ін. [3;10].

Висновки

1. ІП пухлинних клітин у дифузних гліомах ГМ статистично значимо корелює з ступенем злоякісності пухлини (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена $r = 0,756$; $p < 0,05$): високий рівень (ІП > 10%) характерний для 78,6% анапластичних гліом (Grade III за класифікацією ВООЗ) та 83,3% гліобластом (Grade IV); при цьому показники низькозлоякісних дифузних гліом (Grade II) значно нижчі, ніж анапластичних ($p = 0,0001$) та гліобластом ($p < 0,0001$), а останні дві групи гліом характеризуються подібними значеннями ІП ($p = 0,136$), що вірно і при порівнянні астроцитарних (50%) та олігодендрогліальних пухлин (33,3%; $p = 0,459$) на умовах урахування пухлин, що належать лише до Grade II-III.

2. p53-імунопозитивність (>10% пухлинних клітин) характерна для 50% всіх дифузних гліом. При тенденції до зростання частки p53-імунопозитивних пухлин зі збільшенням Grade (Grade II – 35,7%, Grade III – 42,9%, Grade IV – 62,5% пухлин) все одно статистично значуща відмінність відсутня. Експресія p53 (>10%) спостерігається переважно в астроцитарних пухлинах Grade II-IV (57,5%) та не характерна для олігодендрогліальних пухлин (25%), $p = 0,030$, але значущість відмінності олігодендрогліальних та астроцитарних пухлин забезпечена більш високою часткою p53-імунопозитивних гліобластом в останніх.

3. Надекспресія EGFR (>50% площі зрізу) більш характерна для олігодендрогліальних пухлин (58,3%), ніж для астроцитарних пухлин Grade II-III (31,3%), але різниця не вірогідна. Також зі збільшенням Grade гліом спостерігається суттєве зростання частки пухлин з надекспресією EGFR ($p < 0,001$): 21,4% низькозлоякісних гліом, 64,3% анапластичних гліом та 87,5% гліобластом; між першими двома групами різниця є достовірною ($p = 0,046$). Експресія MGMT характерна для 38,5% дифузних гліом, частка MGMT-позитивних гліом не залежить від Grade та типу пухлини ($p > 0,05$).

4. Гліальні пухлини характеризуються частотою надекспресією GFAP (84,6%), проте олігодендрогліальні гліоми відзначаються

суттєво меншою часткою таких пухлин (58,3%) в порівнянні з астроцитарними (92,5%), $p=0,011$. При виключенні з групи астроцитарних пухлин гліобластом така відмінність зберігається ($p=0,043$). Дифузні гліоми не демонструють Grade-залежності рівнів експресії GFAP: Grade II – 71,4%, Grade III – 71,4%, Grade IV – 91,6% пухлин, $p=0,258$.

5. Виражена експресія віментину пухлинними клітинами властива для 85,7% гліобластом (Grade IV), 14,3% анапластичних дифузних гліом, 7,1% пухлин, віднесених до Grade II. Відмінність інтенсивності експресії віментину у гліобластомах та анапластичних гліальних пухлинах є статистично значущою ($p=0,00001$). Статистична достовірність переважання астроцитарних пухлин серед гліом з високими рівнями експресії віментину (95,8% проти 8,3% олігодендрогліом), $p=0,003$, зникає при виключенні гліобластом ($p>0,05$). Проте відсутність експресії віментину ($<10\%$) була продемонстрована виключно олігодендрогліальними з часткою віментин-негативних пухлин 50% ($p=0,001$).

6. Відзначається Grade-залежність панцитокератин-позитивного статусу ($p=0,013$) з переважанням панцитокератин-позитивних гліобластом (66,7%) над такими анапластичними гліомами (28,6%, $p=0,042$) та дифузними гліальними пухлинами Grade II (21,4%). Хибно-позитивний статус за протеїнами епітеліальних проміжних філаментів (панцитокератин AE1/AE3) є характерним для 16,7% олігодендрогліальних та 31,25% астроцитарних пухлин Grade II-III ($p>0,05$).

7. Відсутність експресії GFAP, IDH1 R132H, EGFR ендотеліоцитами і перицитами у разі позитивного статусу пухлинних клітин дозволяє на підставі негативного контрастування мікросудин оцінити і виміряти морфометричні показники без застосування додаткових судиноспецифічних маркерів у дифузних гліомах головного мозку. Висока ЩПМ ($>100/\text{мм}^2$) має місце у гліомах Grade III (64,3%) і Grade IV (66,7%) значно частіше, ніж в пухлинах Grade II (14,3%), $p=0,01$ і $p=0,003$ відповідно. Визначено сильний прямий статистично значущий зв'язок III ендотелію (Ki-67) і Grade за ВООЗ ($r = 0,746$, $p < 0,05$). Високий рівень проліферативної активності ендотелію є властивим для 33,3% дифузних гліом Grade II і для більшості пухлин Grade III і IV (відповідно 78,6% і 91,7%), різниця є статистично вірогідною

($p=0,011$ і $p<0,001$). ЩПМ і III ендотелію є незалежними від типу гліоми (Grade II-III) параметрами ($p>0,05$).

8. Експресія IDH1 R132H характерна для більшості дифузних гліальних пухлин Grade II і III (відповідно – 85,7% і 78,6% пухлин), а також 12,5% гліобластом, що є достовірно менше ніж анапластичних пухлин Grade III ($p<0,001$). 87,5% олігодендрогліальних та 75% астроцитарних пухлин Grade II-III є позитивними за R132H IDH1 ($p>0,05$).

9. У дифузних гліальних пухлинах визначається однакове за локалізацією накопичення MMP3 і MMP9, а для 76,9% дифузних гліом характерна також подібна інтенсивність експресії MMP3 і MMP9. Виражена експресія MMP3 характерна для 70,8% гліобластом (Grade IV), а також для 57,1% анапластичних гліом (Grade III), що достовірно більше ($p=0,025$) ніж дифузних астроцитом та олігодендрогліом разом (14,3%). Високий рівень експресії MMP9 має місце у 42,9% дифузних гліом, а також реєструється у 35,7% анапластичних гліальних пухлин Grade III, що значно менше ($p=0,037$), ніж гліобластом (75%). В олігодендрогліальних пухлинах Grade II-III виражена експресія MMP3 і MMP9 спостерігається так же часто (33,3% і 41,6% відповідно), як і в астроцитарних (37,5%), всі $p>0,05$.

10. Основними маркерами для диференційної діагностики гліом Grade II і III є Ki-67 (III пухлинних клітин), додатковими – GFAP (ЩПМ), MMP3, EGFR, непоказовими – p53, MGMT, віментин, панцитокератин AE1/AE3, MMP9, IDH1 R132H. Допоміжне діагностичне значення має визначення III ендотелію (Ki-67). Основними маркерами для диференційної діагностики гліом Grade III і IV є IDH1 R132H, віментин; додатковими – панцитокератин AE1/AE3, MMP9; непоказовими – Ki-67, p53, MGMT, EGFR, GFAP, MMP3. Основним маркером для диференційної діагностики гліом олігодендрогліального та астроцитарного типу (Grade II-III) є віментин; додатковими – GFAP, непоказовими – Ki-67, p53, MGMT, EGFR, панцитокератин AE1/AE3, MMP, IDH1 R132H.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з розробкою прогностичних і предиктивних критеріїв для дифузних гліальних пухлин головного мозку на підставі показників експресії маркерів молекулярно-біологічних властивостей клітин.

Літературні джерела References

1. Fedorenko ZP, Michailovich YoYo, Goulak LO, Gorokh YeL, Ryzhov AYU, Soumkina OV, Koutsenko LB. Cancer in Ukraine, 2015–2016. Bull

Natl Cancer Register of Ukraine. 2017;18:56-7. Available from: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_18/PDF_E/bull_18_eng.pdf.

2. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology*. 2016 Oct 1;18(5):1-75. doi: 10.1093/neuonc/now207.
3. Caveness WK, Leung SY, Hawkins C, Van Meir EG, Burger PC, Tabori U. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised. Lyon: IARC; 2016. 408 p. ISBN 978-92-832-4492-9.
4. Zozulya YuA, Rozumenko VD, Malysheva TA, Sidorenko SP, Dmitrenko VV, Kavsan VM. [Molecular-genetic descriptions of intracerebral tumours and their value for individualization of treatment and prognosis of clinical course]. *Zhurnal NAMN Ukrainy*. 2016;22(1):21-33. Ukrainian. Available from [http://journal.amnu.gov.ua/site/journal.nsf/id/2E5BD05E9FFA5E9DC22580B00078AA0D/\\$file/Zozulia.pdf](http://journal.amnu.gov.ua/site/journal.nsf/id/2E5BD05E9FFA5E9DC22580B00078AA0D/$file/Zozulia.pdf)
5. Stupp R, Brada M, Van Den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2014 Apr 29;25(3):93-101. doi: 10.1093/annonc/mdu050.
6. Jiang T, Mao Y, Ma W, Mao Q, You Y, Yang X, Jiang C, Kang C, Li X, Chen L, Qiu X. CGCG clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas. *Cancer letters*. 2016 Jun 1;375(2):263-73. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.024.
7. Poslavskaya OV. [Methodology for the use of software for the analysis of digital micrographs on the base of pathomorphology course in order to increase the professional level of students and scientists]. *Morphologia*. 2015;9(3):122-6. Ukrainian. Available from http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2015-09-03/15povrsn.pdf.
8. Shpon'ka IS, Shynkarenko TV, Poslavskaya OV. [Characterization and analysis of Ki-67-immunoreactivity in brain astrocytoma]. *Morphologia*. 2016;10(1):96-101. Ukrainian. Available from http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2016-10-01/16sisagm.pdf.
9. Antomonov M. [Mathematical processing and analysis of medical and biological data.] Kyiv: FMD; 2006. 558 p. Russian.
10. Schiffer D. Brain tumors: biology, pathology and clinical references. Springer Science & Business Media; 2012, 695 p.
11. Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations. *Histochemistry and cell biology*. 2013;140(1):13-22. doi: 10.1007/s00418-013-1101-1.
12. Scheinemann K, Bouffet E, editors. *Pediatric neuro-oncology*. Springer; 2015, 318 p.
13. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer letters*. 2015 Jun 28;362(1):1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.015.
14. Dimitrov L, Hong CS, Yang C, Zhuang Z, Heiss JD. New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. *International journal of medical sciences*. 2015;12(3):201. doi: 10.7150%2Fijms.11047.

Шпонька И.С., Шинкаренко Т.В. Комплексный иммуногистохимический анализ диффузных глиом головного мозга.

Реферат. Дифференциальная диагностика диффузных глиальных опухолей головного мозга затруднена морфологическим сходством опухолей, которые имеют разный злокачественный потенциал. Поэтому целью данного исследования было оптимизировать диагностику глиальных опухолей головного мозга путем определения дифференциальных морфологических критериев на основе изучения особенностей иммуногистохимической экспрессии маркеров биологических свойств клеток. Проведен анализ нарушений регуляции клеточного цикла (Ki-67, EGFR), апоптоза (p53), репарации ДНК (MGMT), протеолиза внеклеточного матрикса (MMP3 и MMP9), нарушений метаболических процессов (IDH1 R132H), изменений ИГХ статуса по белкам промежуточных филаментов (GFAP, виментина, панцитокератина AE1/AE3), а также параметров микроваскулярного русла в зависимости от клинко-морфологических характеристик диффузных глиом. Определены иммунофенотипы характерные для опухолей различного гистологического типа и степени злокачественности по классификации ВОЗ.

Ключевые слова: диффузная глиома, иммуногистохимия, диагностика, индекс пролиферации, ангиогенез, промежуточный филамент, матриксная металлопротеиназа.